

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による
バイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」
研究課題「海洋ハプト藻類のアルケノン合成経路の
解明と基盤技術の開発」

研究終了報告書
[1年追加支援期間分]

研究期間 平成28年 4月～平成29年 3月

研究代表者：白岩善博
(筑波大学生命環境系、名誉教授・特
命教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

過去5年間の成果: H22年度からH27年度において、(1)ハプト藻類の貯蔵脂質である高度不飽和ケトン(アルケノン)合成および高度不飽和脂肪酸合成系に関する代謝系の解明、(2)イオントラップ型質量分析計による海洋藻類のショットガンリポドミクスの技術開発、(3)アルケノン合成ハプト藻の全ゲノム解読、(4)アルケノン合成ハプト藻類が原油代替オイル生産者としての高いポテンシャルを有することの実験的証明、(5)新規脂質体となるアルケノンボディの証明、などアルケノン合成ハプト藻類バイオマスのバイオ燃料生産者としての活用の基盤技術の開発につながる成果を得た。更に、これまでアルケノン生産ハプト藻類株においては、形質転換技術はおろか、コロニー形成株も得られていなかった状況において、*Tisochrysis lutea* 株で寒天上にコロニーを形成させることに成功し、作製した形質転換体のスクリーニングに不可欠な「形質転換細胞の単離」を可能とした。また *T. lutea* 株のトランスクリプトーム解析とゲノム情報解読を進め、形質転換株作出に向けた基盤を確立した。

1年追加支援期間の達成目標: 課題「アルケノンを生産するハプト藻類種における形質転換技術の確立」(項目①)と「アルケノンおよびDHA生合成の代謝系等の代謝改変による有用物質(アルケノン、アルケノン中間体、DHA等)の高生産株の作製系の構築」(項目②)の完成を達成目標とした。

そのため、JST藻類バイオマスエネルギー研究領域の「さきがけ」研究者が確立した「アルケノン非生産ハプト藻(*Pleurochrysis carterae*, TAG合成株)の形質転換系(Endo et al. 2016年3月)」を参考にして、まず具体的に、項目①では *T. lutea* で形質転換技術を確立することとした。項目②では、アルケノン生産については、アルケノンの一部を不飽和化すると予想される酵素の高発現と抑制、アルケノン貯蔵体組成タンパク質の高発現およびトリグリセリド合成遺伝子の抑制を試みた。DHA生産については、 $C_{18:3}$ を $C_{20:3}$ に伸長する遺伝子の高発現と抑制を試みた。さらに、*T. lutea*ではマンニトールへの炭素分配が大きいことから、マンニトール合成遺伝子の抑制で細胞内の炭素フローを変化させ、アルケノンやDHAなどの脂質増産を目標とした。

得られた成果の概要: *Tisochrysis lutea* 形質転換系(核ゲノムへの形質転換)の技術開発に取り組み、薬剤耐性変異株の作出に成功した。これは、世界初のアルケノン生産ハプト藻の形質転換技術確立の成果である。さらに、遺伝子高発現系の構築のための発現ベクターの作製を完了し、ゲノム情報から推測したアルケノン不飽和化酵素候補遺伝子 *DESI* を核ゲノムへ導入することに成功した。そして、*DESI* 導入変異体を20株取得することに成功した。*T. lutea* 株は、既に水産養殖飼料として商業的に広く使われており、中規模培養技術が確立されている。本技術開発によって、更なる高機能細胞株の開発と大量培養系確立によるバイオ燃料生産や水産飼料生産への開発が加速される期待がある。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. ティソクリシス(*Tisochrysis lutea*)形質転換系(核ゲノムへの形質転換)の技術開発に取り組み、薬剤耐性変異株の作出に成功した。これは、世界初のアルケノン生産ハプト藻の形質転換技術確立の成果である。本成果は、現在進行中の項目②における培養細胞の生産性、バイオ燃料の生産量の向上をもたらす高機能細胞株の作出に寄与し、最終的に生産性の向上に貢献する。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「筑波大学」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
白岩 善博	筑波大学 生命環境系	特命教授	H28.4～
鈴木 石根	同上	教授	H28.4～
遠藤 博寿	同上	主任研究員 (H28.4～H28.6) 准教授 (H28.7～)	H28.4～
新家 弘也	同上	助教	H28.4～
埴 優	同上	博士研究員	H28.4～
柴本 理宏	派遣職員	技術補助員	H28.4～

研究項目

1. アルケノンを生産するハプト藻類種における形質転換技術の確立
2. アルケノンおよび DHA 生合成の代謝系等の代謝改変による有用物質 (アルケノン、アルケノン中間体、DHA 等) の高生産株の作製系の構築

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・アルケノン研究に関して、CREST 研究実施時から、北海道大学沢田健(准教授;CREST 共同研究者)、英国グラスゴー大学 Jaime Toney(講師)、同 Ian Watson(Reader)、カナダ・レジャイナ大学 Peter Leavit(教授)との共同研究や連携を維持している。
- ・ハプト藻類の大量生産に関して、大型の閉鎖型高密度達成型バイオリアクターの開発について、企業との連携を模索している。

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 アルケノンを生産するハプト藻類種における形質転換技術の確立(筑波大学白岩グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

Endo et al. (2016) で報告された円石藻 *Pleurochrysis carterae* における外来遺伝子の導入・発現手法をもとに、アルケノン生産種である *Tisochrysis lutea* 形質転換系(核ゲノムへの発現系)の確立を試み、その結果、薬剤耐性変異株の作出に成功した。これは、世界で初めてアルケノン生産種であるハプト藻で形質転換法を確立した成果であり、現在特許出願および論文投稿の準備を進めている。

① 薬剤濃度検討

薬剤は *P. carterae* で阻害効果(濃度 2.5~5 mg/mL)があったハイグロマイシンを使用し、*T. lutea* でも阻害効果があるかを検討した。ハイグロマイシンの濃度は、0.5、1、2.5、5 mg/mL で調べた。ハイグロマイシンを含む人工海水で 1×10^7 個の *T. lutea* 細胞を懸濁し、20°C・連続光照射下で静置培養すると、1 mg/mL 以上のハイグロマイシンを加えた条件で *T. lutea* 細胞が完全に死滅することを確認した。

② 発現用コンストラクトの作製

Endo et al. (2016) によって作製された薬剤耐性遺伝子発現ベクター pFA7 を基に、プロモーターを改変した発現コンストラクトを作製した。pFA7 は pBI221 をベースとしており、薬剤耐性遺伝子は、*Streptomyces* 由来のハイグロマイシン耐性遺伝子である *Aph7* のコドンを変更した *PyAph7*、ターミネーターは *Chlamydomonas reinhardtii* 由来のルビスコ遺伝子のターミネーター(Crrbc2)を用いている

プロモーターは、H27 年度 CREST 研究で我々が行ったトランスクリプトーム解析と公開されているトランスクリプトーム解析結果を基に、高発現が期待される 6 種類の候補を選択した。その中から、H27 年度 CREST 研究で我々が行ったゲノム解析情報を基に、*Lhcf17*(fucoxanthin chlorophyll a/c protein)、*LhcI*(light harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 1) および *Actin 1*(actin beta/gamma 1) の 3 遺伝子について上流配列の取得に成功した。そこで、3 遺伝子それぞれの上流配列をプロモーター配列とし、*PyAph7* の上流に組み込んだ発現ベクターを 3 種類作製した。

③ 遺伝子導入株の選抜と確認方法

遺伝子導入処理した細胞を、1~2 日間、非選抜培地(人工海水 ESM 培地)で培養を行った後、ハイグロマイシン(1.0 mg/mL)を含む平板培地(0.2%ゲランガム)上で 3~4 週間培養を行い、遺伝子導入株の選抜を行った。プロモーターに用いた 3 種類の配列のうち、*Lhcf17* の上流配列を用いたベクターでハイグロマイシン耐性変異体の作出に成功した。プレートから 1 細胞由来のコロニーを単離し、非選抜液体培地中で培養した後ゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA に対して、ハイグロマイシン耐性遺伝子領域を Nested-PCR で増幅し、ハイグロマイシン耐性遺伝子のゲノムへの導入を確認した。当初は約 30%未満の確率でしか選抜し

T. Lutea細胞による蛍光物質の取り込み効率(導入率)

検討事項: PEGIによるFITC-デキストランの導入率

○PEG (MW=2000), FITC-デキストラン (2,000K)を使用

		[全計測細胞数/実験]	[全実験数]
	導入率 (%)	カウント数	n
MaMg溶液	96.2 ± 1.2	190 ± 29	6
W ₅ 溶液	96.6 ± 1.5	174 ± 17	6

たコロニーからバンドの増幅が確認できなかったが、コロニー選抜方の改善により90%以上の確率で選抜したコロニーからバンドの増幅が確認出来るようになった。

④ ゲノム編集の試み

現状では、導入した遺伝子のゲノム上での位置は操作できない非相同性組換えである。特定のゲノム DNA 上に遺伝子を導入する技術やゲノム DNA 上の標的遺伝子をピンポイントで破壊する技術は理想的である。そこで、*T. lutea* への遺伝子導入技術を生かし、CRISPER/Cas9 システムによるゲノム編集を試みた。

3. 2 アルケノンおよび DHA 生合成の代謝系統の代謝改変による有用物質(アルケノン、アルケノン中間体、DHA 等)の高生産株の作製系(筑波大学白岩グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

確立したアルケノン合成ハプト藻類株の形質転換系を用い、*T. lutea* 株でアルケノン(長鎖不飽和ケトン)や長鎖不飽和脂肪酸(DHA)の増産を目指した。また、アルケノンの持つ二重結合の数を制御することでアルケノンの改質を目指した。アルケノンについては、アルケノンの一部を不飽和化すると予想される酵素の高発現と抑制、アルケノン貯蔵体組成タンパク質の高発現およびトリグリセリド合成遺伝子の抑制を試み、アルケノンの改質および増産を図る。DHA については、 $C_{18:3}$ を $C_{20:3}$ に伸長する遺伝子の高発現と抑制を試み、DHA またはアルケノンの増産を図る。また、*T. lutea* においてマンニトールへの炭素分配が大きいことから、マンニトール合成遺伝子の高発現と抑制で細胞内の炭素の流れを変化させ、脂質の増産を図る。

① 遺伝子高発現系の構築

現在まで、不飽和化酵素遺伝子 2 種(*DES1*, *DES2*)、アルケノン貯蔵体組成タンパク質遺伝子(*hp-465517*)、脂肪酸伸長酵素遺伝子(*Elongase*)、マンニトール合成遺伝子 2 種(*MIPase*, *MDH*)を *Lhcf17* の上流配列をプロモーターとし、既に成功したハイグロマイシン耐性遺伝子とタンデムにつないだ発現ベクターを作製した。

② *DES1* 以外の遺伝子の高発現系の構築の試み

内在性遺伝子の高発現による代謝改変の試みとしては、DHA の高生産株の取得を目的として *Elo1*($C_{18:3}$ を $C_{20:3}$ に伸長する酵素遺伝子)の導入を試みた。しかし、変異株の作出には至らなかった。

③ 遺伝子抑制系の構築

遺伝子抑制には RNAi を選択し、ハイグロマイシン耐性遺伝子下流に RNAi 用に *DES1* 遺伝子の配列の一部を逆向きに融合した RNAi 用ベクターを作成した。

§ 4 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 4 件)

1. R. K. Bakku, H. Araie, Y. Hanawa, Y. Shiraiwa and I. Suzuki, Changes in the accumulation of alkenones and lipids under nitrogen limitation and its relation to other energy storage metabolites in the haptophyte alga *Emiliana huxleyi* CCMP 2090, *Journal of Applied Phycology* (in press). Published online on May 24, 2017. DOI 10.1007/s10811-017-1163-x
2. K. Saruwatari, M. Satoh N. Harada, I. Suzuki and Y. Shiraiwa, Change in coccolith size and morphology due to response to temperature and salinity in coccolithophore *Emiliana huxleyi* (Haptophyta) isolated from the Bering and Chukchi seas, *Biogeosciences*, Vol. 13, pp. 1-13, 2016.
3. A. Pelusi, Y. Hanawa, H. Araie, I. Suzuki, M. Giordano, and Y. Shiraiwa, Rapid detection and quantification of haptophyte alkenones by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). *Algal Research*, Vol. 19, pp.48-56, 2016.
4. H. Nakamura, K. Sawada, H. Araie, T. Shiratori, K. Ishida, I. Suzuki and Y. Shiraiwa, Composition of long chain alkenones and alkenoates as a function of growth temperature in marine haptophyte *Tisochrysis lutea*. *Organic Geochemistry*, Vol. 99, pp.78-89, 2016.

(2) その他の著作物(総説、書籍など)(和文 1 件、欧文 1 件)

1. Y. Hanawa and Y. Shiraiwa (2017) Determination of Storage Lipid Contents by Total Organic Carbon (TOC) Analyzer and Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) in Non-Destructive Microalgal Cells – A New Method for the Semi-Quantitative Analysis of Long-Chain Ketones (Alkenones) Produced by Marine Haptophyte Algae. Shimadzu Application Note (in press) [English version of #2]
2. 埴 優、白岩 善博: 全有機体炭素計(TOC計)とフーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)を用いた微細藻類の細胞非破壊系での簡便な貯蔵脂質の生産性評価 -海洋ハプト藻が合成する長鎖不飽和ケトン(アルケノン)の定量技術開発-、島津アプリケーションノート No. 43, LAAN-C-XX044, 島津製作所、2017年3月。[#1の日本語版]

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 0 件、国際会議 2 件)

1. Y. Shiraiwa, H. Araie, Y. Hanawa, H. Endo, I. Suzuki I, H. Nakamura and K. Sawada, Biofuel and biorefinery production by marine haptophytes, The 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC) 2017, University of Hawaii at Manoa, International Conference Center, Honolulu, Hawaii, USA, May 21-24, 2017 (Invited speaker in the JST-sponsored Symposium)
2. 国際会議におけるシンポジウムを企画・実施
T. Matsunaga, S. Miyagishima, Y. Shiraiwa (Conveners), JST-sponsored Symposium and Related Session on Marine Algal Bioenergy and Biorefinery Production-Genome Analyses, Metabolic Engineering and Processing of Marine Microalgae-, The 11th International Marine Biotechnology Conference (IMBC 2016), Baltimore, USA, Aug 28-Sep 2, 2016.

② 口頭発表 (国内会議 3 件、国際会議 2 件)

1. 新家弘也、竹島薪人、鈴木石根、白岩善博, アルケノン産生ハプト藻における貯蔵物質への炭素分配様式の解析、第19回マリンバイオテクノロジー学会大会、仙台、2017年6月4日
2. H. Araie H, Y. Hase, Y. Ohno, I. Suzuki and Y. Shiraiwa, Breeding of alkenones

producing haptophyte using heavy ion-beam irradiation. The 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC) 2017, University of Hawaii at Manoa, International Conference Center, Honolulu, Hawaii, USA, May 21-24, 2017 (Invited speaker in the JST-sponsored Symposium)

3. Yoshihiro Shiraiwa, Production of two kinds of biofuel and biorefinery candidates by marine haptophytes, The 11th International Marine Biotechnology Conference (IMBC 2016), Baltimore, USA, Aug 28-Sep 2
4. 新家弘也、中村英人、沢田健、Heather Haig、Jaime Toney、Peter Leavit、鈴木石根、白岩善博、カナダ内陸湖からのアルケノ合成種の発見と単離、マリンバイオテクノロジー学会、函館、2016年5月28日
5. JMM Recto、辻敬典、新家弘也、鈴木石根、白岩善博、海洋ハプト藻類のマニトール合成と関連酵素の特性解析、マリンバイオテクノロジー学会、函館、2016年5月28日

③ ポスター発表 (国内会議 1 件、国際会議 1 件)

1. 新家 弘也、鈴木 石根、白岩 善博(筑波大学・生命環境系)、長谷 純宏、大野 豊(量研機構・高崎研)、オイル産生藻のイオンビーム育種、第1回 QST 高崎研シンポジウム、高崎、2017年1月26日
2. R. K. Bakku, H. Araie, Y. Shiraiwa and I. Suzuki, Study of relationship of alkenones and other lipid metabolism from lipidomics and carbon allocation studies in *Emiliana huxleyi* CCMP 2090, The 9th Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology, Bangkok, Thailand, Nov 15- Nov 18.

その他(1 件)

1. 「アルケノンに関する国際共同研究」に関する EU Fund (ALKENoNE by J. Toney, Univ. of Glasgow, UK)と CREST/JST (白岩善博)の Joint-Meeting の実施
J. Toney and Y. Shiraiwa (Conveners), Joint-Meeting on Alkenone Study, Kinugawa and Nikko, Japan, July6-9, 2016.

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・ CREST で購入した機器の新たな利用法について、TOC 計と FT-IR 装置の活用に関してはメーカー(島津製作所)に情報提供するなどのフィードバックし、解説記事などで一般にも情報の提供を進めた。
- ・ 同様に、開発した「藻類リポミクス」解析法について、雑誌で解説記事を公表した。

②社会還元的な展開活動

- ・ 本研究成果を学術論文、総説等として公表し、更に、インターネット(URL; <http://plmet.biol.tsukuba.ac.jp/>)で公開し、一般に情報提供している。
- ・ さらに、国際会議などでシンポジウムを企画し、積極的に講演するなど、国外向けにも研究成果を発信している。
- ・ つくばエキスポセンター(つくば科学万博記念財団、つくば市)における「おとなのサイエンス講座」の総合コーディネーターを務めるとともに、本 CREST 課題の研究成果に関連する講義を行い広報に継続的に努めている。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2017年5月21～24日	第11回アジアパシフィックマリンバイオテクノロジー学会(APMBC2017)	アメリカ合衆国・ホノルル	200人	JST/CREST(松永領域代表)の中島田豊教授(広島大学)の企画によるJST-Symposiumにおいて、本CREST研究課題の一部について研究成果を発表した。
2016年8月28日～9月2日	第11回国際マリンバイオテクノロジー国際会議(IMBC2016)	アメリカ合衆国・ボルチモア	250人	本CREST代表者、白岩善博が企画に参加した。藻類脂質に関する生理学・生化学の研究成果を発表するシンポジウムおよび関連セッションを企画・開催した。(発表件数16件)
2016年9月13日	上田高校実験実習	筑波大学生命環境系	30人	アウトリーチ活動。長野県上田高校に対するCREST研究紹介と公開実験を実施した。
2016年09月12日～13日	米軍子弟高実験実習 茨城県牛久栄進高校	筑波大学生命環境系	8人	太平洋地区米軍基地(三沢, 横田, 座間, 横須賀, 岩国, 佐世保, 嘉手納, グラム, ソウル)かつ茨城県牛久栄進高校の高校生に対するCREST研究紹介と公開実験を実施した。
2016年8月2日	埼玉県立所沢北高等学校実験実習	筑波大学生命環境系	22人	アウトリーチ活動。埼玉県立所沢北高等学校に対するCREST研究紹介と公開実験を実施した。
2016年8月1日	神奈川県立西湘高校実験実習	筑波大学生命環境系	19人	アウトリーチ活動。神奈川県立西湘高校に対するCREST研究紹介と公開実験を実施した。
2016年7月6日～9日	ALKENoNE ミーティング	栃木県・鬼怒川/日光	10人	長鎖不飽和ケトン・アルケノンに関連した生物科学と地球科学の共同国際シンポジウムを開催した(非公開)。 グラスゴー大学のJaime Toney博士と本CREST代表者、白岩善博が企画した

§ 6 最後に

- 研究の目標等から見た達成度、

項目①および項目②のそれぞれについて、1ヶ月および2ヶ月遅れで推移し、DHA生産を強化する変異株の作製以外では目標を達成した。

- 得られた成果の意義等の自己評価、

アルケノン合成ハプト藻類 *T. lutea* 株の形質転換技術の確立は、学術的に優れた評価が得られることに加え、既に産業化している水産餌料としての利用に対して、更に高機能性を付与した培養株の提供が可能となり、当該藻類株の新たな活用の可能性を拓く有用なものであると評価している。

- 今後の研究の展開、

本研究成果で開発した形質転換技術は、基本的にはPEG法を基本に対象藻類株に適合する細胞処理技術の新たな開発によって組み立てられたものである。したがって、遺伝子のみならず、マクロ分子の細胞への導入をも可能とするもので、当該ハプト藻類株が2nのゲノムを有することと合わせて、CRISPER/Cas9を初め、新規のゲノム編集技術の開発にも応用できる技術となっている。今後、具体的な研究計画を企画することによって、新たなゲノム編集技術の開発のモデル実験系として活用でき、藻類のゲノム編集技術の大きな発展に寄与することが期待される。具体的には、NEDOのゲノム編集に関する研究グループの研究分担者として、ハプト藻類の形質転換技術を活用する研究を開始している。

- その他

本1年追加支援には感謝している。本研究チームが5年のCREST研究機関で成し遂げたアルケノン合成ハプト藻類株を活用するバイオ燃料・バイオリファイナリー生産に関する研究で成し遂げることができなかった一部の研究項目について、同領域の「さきがけ」研究者の持つ技術を参考に、新たなチーム構成によって技術開発に取り組んだ結果、それを可能とする道を拓くことができた。「CREST」と「さきがけ」の双方の研究成果と状況を総合的に俯瞰することで、本チームの5年間の研究成果を更に発展させることができ、新たな技術開発につながったことは、研究総括、評価委員会、JSTの先見の明によるものと深く感謝する。

